昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2008，51(6)：618 – 627 ISSN 0454-6296

印楝素对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用

钟国华，水克娟，吕朝军，贾建文，任太军，胡美英*

（华南农业大学昆虫毒理研究室，广州 510642）

摘要：本文以喜树碱（camptothecin）作对比，以二甲基亚砜（DMSO）作对照，系统研究了印楝素（azadirachtin）对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 离体细胞系（SL-1）的凋亡诱导作用。印楝素 0.75 μg/mL 处理后 SL-1 细胞后 12～72 h，倒置显微镜观察可见大量细胞皱缩，体积变小，胞膜气泡化，与邻周细胞脱落，胞浆浓缩，胞膜突起，细胞器密集，核染色质浓缩并凝聚在核膜周边，出现大量凋亡小体；AO 染色荧光显微镜观察可见细胞核内致密明亮黄绿色荧光和亮绿色或橘黄色的凋亡小体；透射电镜观察可见细胞皱缩、微绒毛消失、染色质浓缩和边缘化、核膜皱缩界限模糊、部分线粒体嵴结构消失和数量明显增加的吞噬泡等细胞凋亡典型形态学特征；TUNEL 实验可见大量被标记为小圆形或环形黄绿色或绿色荧光的阳性凋亡细胞。流式细胞仪测定表明，印楝素 0.75 μg/mL 处理后 48 h 凋亡率最高达 11.45%，比对照提高 381.3 倍；而喜树碱以 1.72 μg/mL 处理亦对 SL-1 具有相似的诱导作用，处理后 36 h 凋亡率最高达到 17.42%。扫描电镜观察表明，印楝素和喜树碱处理后，SL-1 细胞表面没有形成明显的‘孔’、‘洞’、‘门’之类的结构破坏。推测印楝素与喜树碱对 SL-1 的凋亡信号转导方式和途径不同，导致细胞凋亡时序性不同。

关键词：印楝素；喜树碱；SL-1 细胞；细胞凋亡诱导；显微形态；超微结构

中图分类号：S482.39 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2008)06-0618-10

Induction of apoptosis by azadirachtin, a botanical insecticidal component, in *Spodoptera litura* cultured cell line SL-1

ZHONG Guo-Hua, SHUI Ke-Juan, LU Chao-Jun, JIA Jian-Wen, REN Tai-Jun, HU Mei-Ying* (Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The induction of apoptosis of azadirachtin in *Spodoptera litura* cultured cell line SL-1 at different time after treatment was determined and compared with comptothecin, with DMSO as the control. The results showed that in 12 – 72 h after treatment with azadirachtin at a concentration of 0.75 μg/mL, the typical morphological characteristics of apoptosis appeared. Observed with the inverted phase contrast microscope (IPCM), the drastic morphological changes were found including cell shrinkage, cells diminishing, membrane blebbing, gaps increasing, organelle condensation, nuclei excursion, and a lot of apoptotic bodies. Stained with 5 μg/mL acridine orange (AO), SL-1 cells were observed with yellow bright spots in the nuclei, chromatin condensation, and a few of green bright or saffron yellow apoptotic bodies by visual examinations in fluorescence microscopy (FM). The ultrastructure of SL-1 cells treated with 0.75 μg/mL azadirachtin displayed apoptotic changes observed with transmission electron microscopy (TEM), including cell shrinkage, microvilli decreasing, chromatin condensation and fragmentation, gaps of nuclear envelope, small vacuoles and so on. A number of apoptotic cells were marked with small rotund or ring fluorescence in TUNEL test. The maximum apoptotic rate reached 11.45% 48 h after SL-1 cells treated with azadirachtin at a concentration of 0.75 μg/mL by flow cytometric, which was 381.3 times as high as that of the control. Camptothecin, a known natural component with extraordinary induction of cancer cells apoptosis, possessed similar induction of apoptosis to SL-1 cells treated with 1.72 μg/mL in a series of examinations, including IPCM, FM, TEM and TUNEL assay, and got 17.42% of the maximum apoptotic rate 36 h after treatment. The observations by scan

---

基金项目：国家自然科学基金项目（30500335）；教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金（2004061）

作者简介：钟国华，男，1973 年生，博士，副教授，主要研究方向为昆虫生理毒理和细胞生物学及天然源农药，Tel.：020-85280308；E-mail：guohuazhong@scau.edu.cn；guohuazhong@tom.com

* **通讯作者** Author correspondence，Tel.：020-85280308；E-mail：humy@scau.edu.cn

收稿日期 Received：2007-12-10；**接受日期** Accepted：2008-05-09

electron microscopy showed，however，that SL-1 cells kept whole orbicular membrane surface after treatment with both azadirachtin and camptothecin and showed no significant difference from the control cells. From these results，it was inferred that azadirachtin and camptothecin may possess different apoptotic signal transduction pathways and/or approaches，causing the different apoptotic time orders.

Key words：Azadirachtin；camptothecin；*Spodoptera litura* cultured cell line（SL-1）；apoptosis induction；microstructure；ultrastructure

细胞凋亡（apoptosis）是多细胞生物在机体生长发育、细胞分化等由基因调控的细胞主动性死亡过程（彭黎明和王曾礼，2000），Kerr 等学者于 20 世纪 70 年代明确提出（Kerr *et al*.，1972，1994），80 年代后成为国际研究热点持续至今，并取得重大突破。研究结果表明，多种外源物质都可能促进或抑制细胞凋亡的发生，对其进程、信号转导、归趋等产生重要影响（Rhee *et al*.，2002；Lim *et al*.，2004；夏嫱等，2005；Luo and Pang，2006；Zhang *et al*.，2006；戴璇颖等，2006；Callus and Vaux，2007；Parthasarathy and Palli，2007）。但植物源杀虫剂对昆虫细胞凋亡影响的文献报道甚少。印楝素（azadirachtin）是从楝科（Meliaceae）植物印楝 *Azadirachta indica* A. Juss 分离得到的柠檬素类（limonoids）四环三萜化合物，对 200 多种昆虫具有拒食、忌避、生长发育调节等活性，作用位点很多，一般认为主要是通过作用于神经分泌系统、前胸腺，影响促前胸腺激素（prothoracotropic hormone，PTTH）的合成与释放，从而起到生长发育调节作用，但具体作用机制研究长期以来并没有明显进展，整体上仍处于组织水平或亚细胞水平（Schmutterer，1990，1995，2002）。笔者在研究印楝素细胞毒理时，以斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 离体细胞系 SL-1 为供试细胞，以细胞凋亡典型诱导化合物喜树碱（camptothecin）作对比，通过一系列研究明确了印楝素对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用，为研究印楝素作用机理提供新思路。

1　材料与方法

1.1　供试材料、细胞培养和处理

主要生化试剂包括苔盼蓝，Triton X-100，RNase A，PI，柠檬酸钠（Sigma 公司），DMSO，EDTA（Amresco 公司），琼脂糖（西班牙 Biowest 公司），Tris（Roche 公司），Hepes（MDBio 公司）等，均为分析纯试剂和常规耗材。

供试昆虫细胞为斜纹夜蛾 *Spodotera litura* SL-1 细胞系，在本室采用常规方法置于 Heal Force CO_2 培养箱（德国 Heraeus 公司）27℃恒温常规培养。细胞培养基主要成分包括 Grace's 昆虫干粉培养基（Gibco 公司）、热灭活胎牛血清（FBS，Gibco 公司），酵母提取物、蛋白胨（Sigma 公司）等。细胞传代培养、冻存复苏按常规方法进行。

供试药剂为印楝素 A（$C_{35}H_{44}O_{16}$，M = 720.00，纯度 99.00%，Sigma 公司），喜树碱（$C_{20}H_{16}N_2O_4$，M = 348.34，纯度 99.64%，四川锶全天然产物有限公司）。根据前期研究结果（钟国华等，2008），确定以印楝素终浓度 0.75 μg/mL，喜树碱终浓度 1.72 μg/mL（即 5.0 μmol/L）处理供试细胞，对照以二甲基亚砜（DMSO）处理。

1.2　倒置显微镜形态学检测

供试 SL-1 细胞生长至占培养皿70%～80%时吸出全部条件培养液并加入新鲜培养液，24 h 后在条件培养液中分别加入供试浓度印楝素和喜树碱，混匀后在倒置显微镜（Olympus 公司）下观察，拍片记录细胞形态学变化。

1.3　荧光显微镜形态学分析

取对数生长期 SL-1 细胞（约 1×10^4 个/mL）在洁净盖玻片上进行细胞爬片，置于 35 mm 培养皿中正常培养，待细胞生长至 70%～80%满时吸出全部条件培养液并加入新鲜培养液，24 h 后在条件培养液中加入供试浓度的印楝素和喜树碱以诱导 SL-1 细胞凋亡。处理 72 h 后，分别加入终浓度 5 μg/mL 吖啶橙（acridine orange，AO）孵育，荧光显微镜（Olympus 公司）观察形态学变化。

1.4　透射电镜形态学分析

分别取由供试浓度印楝素和喜树碱诱导的 SL-1 凋亡细胞约 1×10^6 个/mL，pH 7.2，0.02 mol/L 磷酸缓冲液（PBS）清洗后，以戊二醛低温固定过夜，离心，弃上清液后将沉淀用琼脂粉预包埋，冷却凝固后切片，然后用上述 PBS 漂洗，1%锇酸固定后再用上述 PBS 漂洗，然后依次以 50%，70%，80%，90%和 100%乙醇脱水。环氧丙烷脱水过夜。以环氧丙烷和 Epon812 环氧树脂比例分别为 3∶1，1∶1 和 1∶3 混合物依次进行渗透。纯 Epon812 环氧树脂包埋，室

温过夜，置45℃和60℃烘箱中分别聚合24 h后进行常规修块、定位与切片，醋酸铀-柠檬酸铅双重染色，TECNAI G2 12分析型透射电镜（荷兰FEI电子光学有限公司）观察细胞内部形态。

1.5 TUNEL法检测DNA断裂

SL-1细胞凋亡诱导处理同‘1.3荧光显微镜形态学分析”。按照脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotin dUTP nick end labelling，TUNEL）试剂盒（*In Situ* Cell Death Detection Kit，Fluorescein）说明书，用新配制的固定液固定细胞样品后，pH 7.2，0.01 mol/L PBS清洗，加渗透液于冰上孵育。上述PBS清洗样品，室温干燥样品周围区域后，加入TUNEL反应液。以不含末端转移酶的标记液代替TUNEL反应液孵育已固定和渗透好的细胞作为阴性对照；在标记前用DNase Ⅰ（1级）孵育细胞10 min诱导DNA链断裂，作为阳性对照。样品在37℃避光且空气湿润条件下孵育，上述PBS洗样品后即可在荧光显微镜下分析并拍照。

1.6 细胞凋亡率流式细胞仪分析

参照Léry等（1999）方法，取以印楝素和喜树碱分别诱导不同时间的SL-1细胞约2×10^6个，离心后弃上清液，用预冷pH 7.2，0.01 mol/L PBS悬浮细胞，振荡同时加入预冷乙醇固定。过夜后离心弃上清液，相同PBS清洗后加入PI染液，常温避光孵育30 min直接在流式细胞仪（BD公司）检测凋亡率。

1.7 细胞表面扫描电镜分析

取以印楝素和喜树碱供试浓度处理的SL-1细胞约1×10^6个，离心，弃上清液后戊二醛固定过夜，离心，去上清液，用预冷的pH 7.2，0.02 mol/L PBS漂洗，1%锇酸固定后再以相同PBS漂洗，依次使用50%，70%，80%，90%和100%乙醇脱水。乙酸正戊脂脱水。喷金后XL-30ESEM环境扫描电子显微镜（荷兰FEI电子光学有限公司）观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 印楝素诱导SL-1细胞凋亡的倒置相差显微形态学特征

以印楝素0.75 μg/mL和喜树碱1.72 μg/mL作为处理浓度，这两种浓度对SL-1细胞凋亡诱导作用的倒置相差显微形态特征见图1。印楝素0.75 μg/mL处理SL-1细胞0～60 h的倒置显微形态特征见图1（A～E）。从形态学判断，处理后2 h即始见大部分细胞皱缩成圆形，保持正常梭形的细胞比例显著减少，处理后24 h细胞间隔增大，细胞核明显偏移，但外部细胞膜无明显破坏，凋亡小体少（图1：B）。处理后36，48，54 h，凋亡小体数量逐渐增多，大量凋亡小体聚集在细胞周围（图1：C，D）。60 h后为凋亡晚期，凋亡小体被吞噬，凋亡小体数量明显减少（图1：E）。

供试SL-1细胞以喜树碱1.72 μg/mL处理后60 h内的形态学变化见图1（F～J）。处理后4 h仅有部分细胞出现皱缩，处理20～24 h后，细胞间隔增大，细胞核偏移（图1：G）。处理30～54 h后聚集凋亡小体数量不断增多并逐渐扩散，尤其以48～54 h凋亡小体数量最多，最为典型（图1：H，I）。处理60 h后凋亡小体数量显著减少，可见细胞内空泡结构等现象（图1：J）。

2.2 印楝素诱导SL-1细胞凋亡的荧光显微形态学特征

凋亡小体的出现是在凋亡晚期和末期，在凋亡早期，核内染色质聚集边缘化是典型特征之一，光学显微镜难以检测，荧光显微镜以其较高的灵敏度和特异的荧光探针可准确检测到凋亡早期染色体变化而得到广泛运用，常与其他检测方法联合使用互相印证（Gerschenson and Rotello，1992；Hacker，2000）。为进一步确证凋亡的发生，本文采用DNA特异性结合荧光探针AO对印楝素与喜树碱诱导SL-1凋亡进行荧光显微镜检测，结果见图2。CK细胞经AO染色后呈现均匀绿色荧光，细胞核清晰可见（图2：A）；高热坏死细胞与CK细胞相比，其荧光强度明显加强，呈现均匀清晰绿色荧光，细胞核与细胞质无明显界限（图2：B）。印楝素0.75 μg/mL诱导SL-1细胞凋亡的AO荧光显微形态特征变化见图2（C～F）。印楝素诱导处理SL-1后12 h，此时细胞处于凋亡早期，呈不均匀绿色荧光，可见有大小不一的绿色亮点聚集于细胞膜、细胞核与细胞质不清晰，与正常和高热坏死细胞均有所不同，处理后12～36 h，均可见核内致密明亮黄绿色荧光（图2：C），处于凋亡中期。处理后48～72 h除核内致密明亮黄绿色荧光，还可见亮绿色或橘黄色的凋亡小体，处于凋亡晚期（图2：D～F）。但至72 h核内致密明亮黄绿色荧光和亮绿色或橘黄色的凋亡小体均减少。作为对比的喜树碱1.72 μg/mL诱导SL-1细胞凋亡的荧光显微形态变化结果与印楝素处理相似，诱导12 h后呈不均匀绿色荧光，可见有大小不一的绿色亮点聚集于细胞膜，处于凋亡早期，诱导处理后24～72 h皆可

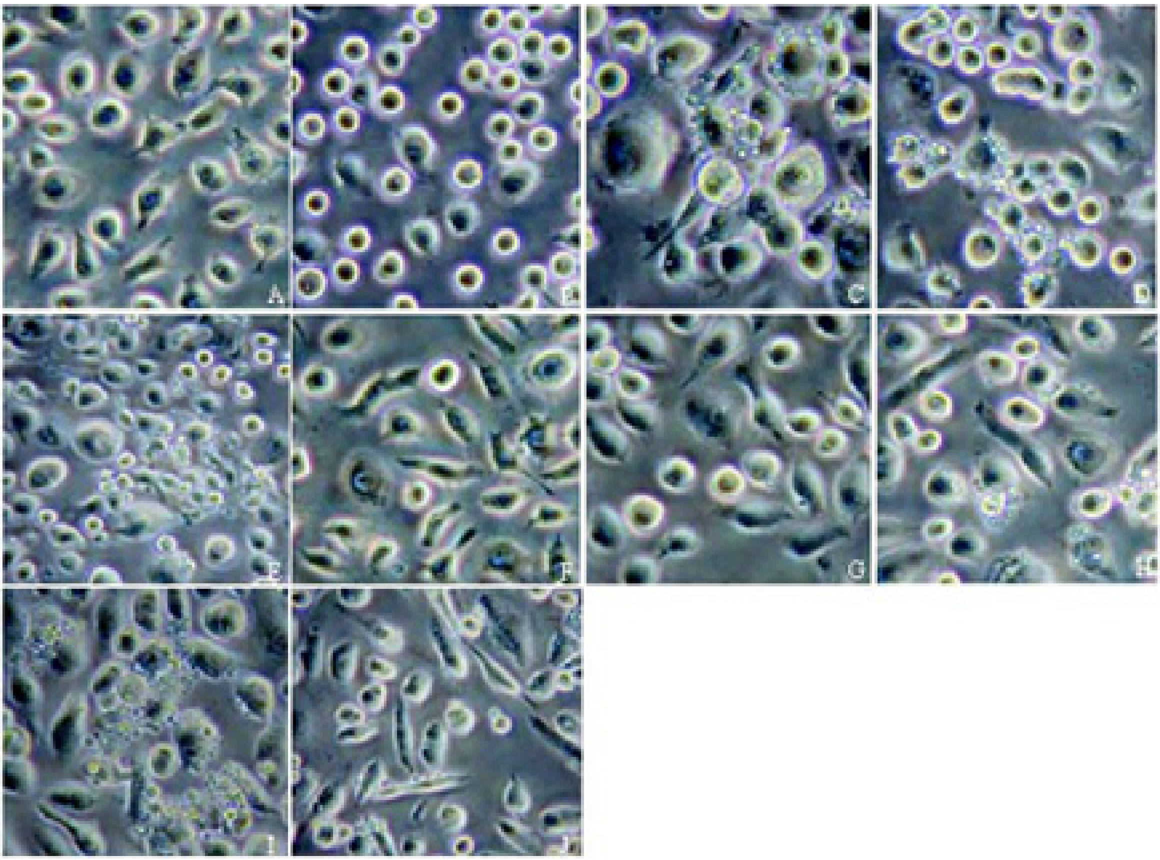

图 1　印楝素和喜树碱诱导 SL-1 细胞凋亡倒置显微形态变化

Fig. 1　Morphological changes of SL-1 cells in apoptosis induced by azadirachtin and camptothecin observed with the inverted phase contrast microscope

印楝素和喜树碱供试终浓度分别为 0.75 μg/mL **和** 1.72 μg/mL；**图** 2－6 **同**。The final concentrations of azadirachtin and camptothecin were 0.75 μg/mL and 1.72 μg/mL, respectively; the same for Figs. 2－6. A,B,C,D,E：**印楝素** Azadirachtin (0, 24, 48, 54, 60 h, respectively)；F,G,H,I,J：**喜树碱** Camptothecin (0, 24, 48, 54, 60 h, respectively)

见核内致密明亮黄绿色荧光和亮绿色或橘黄色凋亡小体(图 2：G～J)，处理后 72 h 核内致密明亮黄绿色荧光和亮绿色或橘黄色的凋亡小体均减少。荧光显微镜形态观察指示被诱导 SL-1 细胞与高热坏死细胞具有明显区别，明确 SL-1 细胞是被诱导凋亡而非坏死。

2.3　印楝素诱导 SL-1 细胞凋亡的透射电镜超微结构形态学特征

透射电镜观察结果被认为是确定凋亡发生的最有力证据之一，是判断凋亡最可靠的方法(Baxa *et al*., 2005)。印楝素和喜树碱诱导 SL-1 细胞凋亡的透射电镜超微结构形态学特征变化结果见图 3。CK 细胞染色质均匀分布在核中，核膜双层膜界限清晰(图 3：A，B)。印楝素 0.75 μg/mL 诱导 SL-1 处理后 24 h，可见细胞皱缩、微绒毛减少、染色质边集、部分核膜界限模糊和线粒体肿胀但结构完整(图 3：C，D)；处理后 40 h 出现细胞凋亡典型形态学特征，细胞皱缩、微绒毛消失、染色质边集、核膜皱缩、全部核膜界限模糊、部分线粒体嵴结构消失和数量明显增加的吞噬泡 (图 3：E，F)。喜树碱 1.72 μg/mL 诱导处理后 15 h，SL-1 细胞皱缩、微绒毛消失、染色质边集、核膜皱缩且界限模糊、线粒体肿胀 (图 3：G，H)。处理后 24 h，上述形态特征进一步加强，还可见吞噬泡数量明显增加、线粒体数量明显减少 (图 3：I，J)。结果表明，两者处理过程中均呈现凋亡典型形态学特征，如细胞核核膜皱缩、染色质边集、微绒毛消失和凋亡小体数量增加相似，但印楝素使线粒体嵴结构消失，而喜树碱使线粒体数量明显减少，吞噬泡数量明显增加。

2.4　TUNEL 法检测 SL-1 细胞凋亡 DNA 断裂

TUNEL 法检测经印楝素和喜树碱诱导处理后 SL-1 的 DNA 断裂结果见图 4。阴性对照(即正常培养细胞)的 TUNEL 检测图片，细胞基本不着色(图 4：A)；阳性对照为 DNase Ⅰ 消化处理的正常培养细胞，被标记为呈小圆形或环形黄绿色或绿色荧光(图 4：B)。印楝素 0.75 μg/mL 处理后 12 h 可见部分细

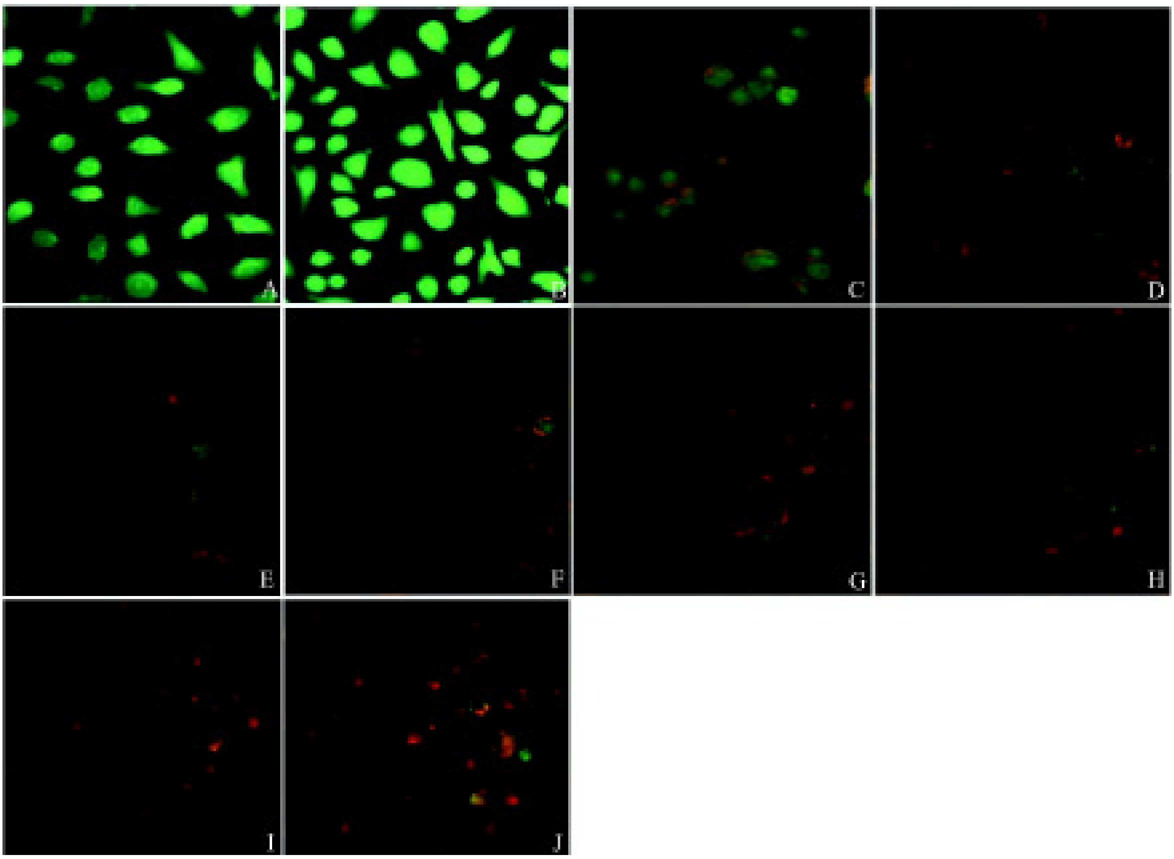

图 2　印楝素和喜树碱处理诱导 SL-1 细胞凋亡的荧光显微形态变化（AO 染色）

Fig. 2　Morphological changes of SL-1 cells in apoptosis induced by azadirachtin and camptothecin observed with the fluorescence microscopy (stained with 5 μg/mL acridine orange)

A：对照 CK；B：高温 High temperature；C，D，E，F：印楝素 Azadirachtin (36, 48, 60, 72 h, respectively)；G，H，I，J：喜树碱 Camptothecin (36, 48, 60, 72 h, respectively)

胞被标记为小圆形或环形黄绿色或绿色荧光，呈阳性（图 4：C）。随着处理时间的延长，阳性标记比例增多，荧光强度增强，至 40 h 和 66 h，出现典型的凋亡小体（图 4：C ~ E），说明随时间延长凋亡细胞数量增加，断裂程度加深。喜树碱 1.72 μg/mL 处理后各时间段与印楝素 0.75 μg/mL 处理相似（图 4：F ~ H）。

2.5　印楝素诱导 SL-1 的细胞凋亡率

流式细胞仪检测结果表明，SL-1 细胞 CK 凋亡率仅为 0.03%，而以印楝素 0.75 μg/mL 诱导处理 SL-1 细胞后 24，36，48，60 h，平均凋亡率分别为 1.03%，5.17%，11.45%和 7.74%，凋亡率分别比 CK 提高了 34.3，172.3，381.3，258 倍，凋亡率随时间呈规律性变化，处理后 0 ~ 48 h 凋亡率不断增加，48 h 达到最大值，而 60 h 有所下降。相比之下，喜树碱 1.72 μg/mL 诱导 SL-1 细胞凋亡作用速度似乎更快，处理后 12，24 h 凋亡率分别为 5.36%和 10.71%，处理后 36 h 凋亡率最高达 17.42%，48 h 凋亡率 15.13%，处理后 12，24，36，48 h 凋亡率分别比 CK 提高 178.7，357，580.7，504.3 倍。

2.6　印楝素处理对 SL-1 细胞表面结构的影响

扫描电镜研究结果表明，印楝素 0.75 μg/mL 和喜树碱 1.72 μg/mL 处理的 SL-1 细胞表面没有明显的‘孔’‘洞’‘门’之类的结构破坏，即使在凋亡高峰到来之前（如印楝素 0.75 μg/mL 处理后 36 h，或喜树碱 1.72 μg/mL 处理后 24 h），SL-1 细胞表面仍没有显著的结构破坏（图 5）。这个结果印证了本实验浓度下印楝素和喜树碱处理确实引起了 SL-1 凋亡而不是坏死，也预示着这两种化合物诱导凋亡可能是通过启动细胞膜表面上的相关信号转导途径。

3　讨论

近年来印楝素等印楝提取物的细胞毒理机制研究报道渐多。如 Bose 等（2007）报道认为印楝叶制剂可以刺激外周血单个核细胞（human peripheral

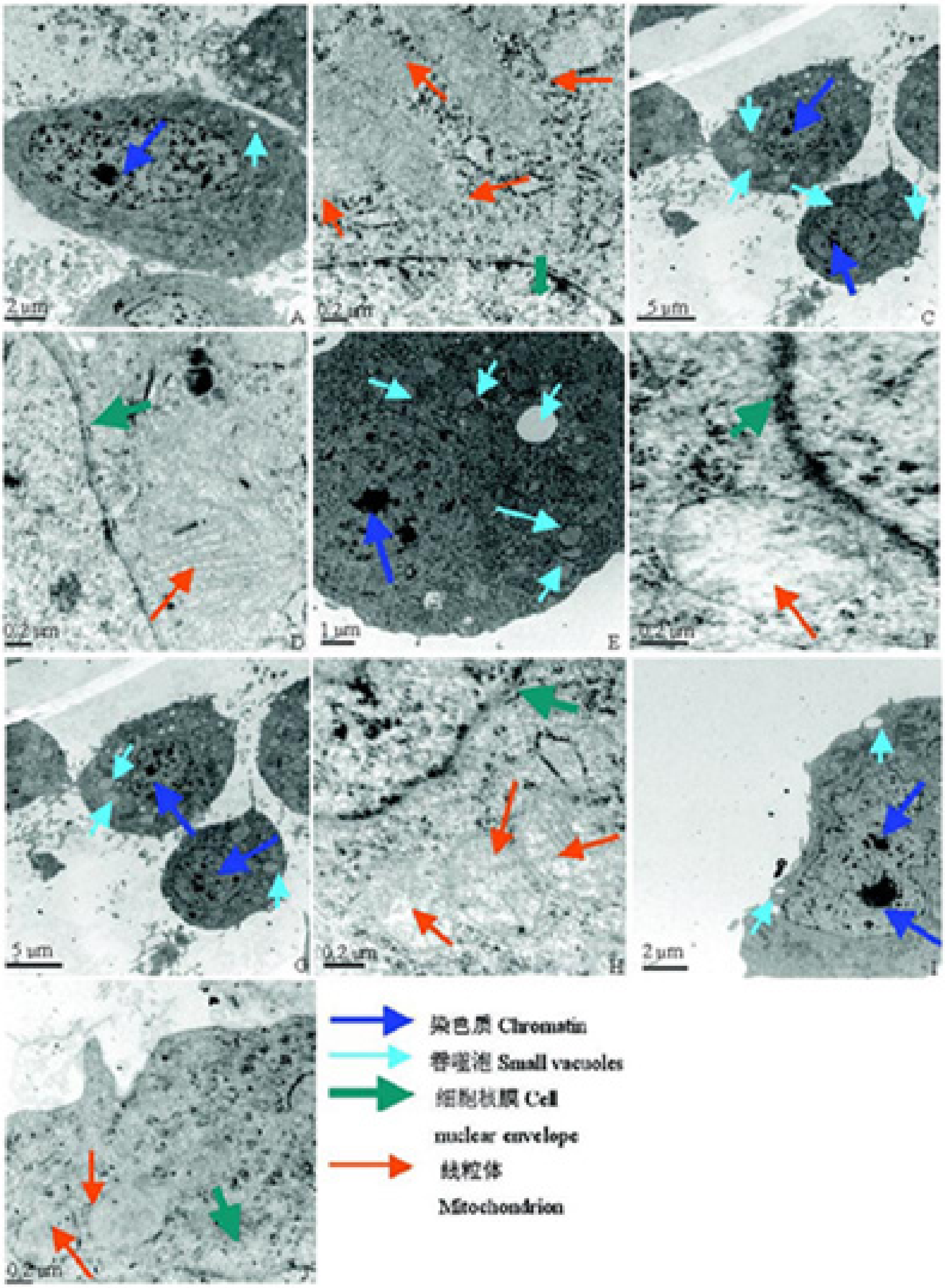

图 3　印楝素和喜树碱诱导 SL-1 细胞凋亡的 TEM 超微结构形态学特征

Fig. 3　Ultrastructure changes of SL-1 cells in apoptosis induced by azadirachtin and camptothecin observed with the transmission electron microscopy

A，C，E，G，I：示细胞整体 The whole cell；B，D，F，H，J：示核膜和线粒体嵴结构 The karyotheca and mitochondrial ridge. A 对照 CK；B：对照 CK；C，D：印楝素 Azadirachtin（24 h）；E，F：印楝素 Azadirachtin（40 h）；G，H：喜树碱 Camptothecin（15 h）；I，J：喜树碱 Camptothecin（24 h）

blood mononuclear cell，PBMC）释放具有细胞毒性的肌动蛋白从而诱导肿瘤细胞凋亡，但不能直接诱导肿瘤细胞系 KB，MCF7 和 K562 产生细胞凋亡。Roy 等（2006，2007）从印楝花中提取了一种命名为

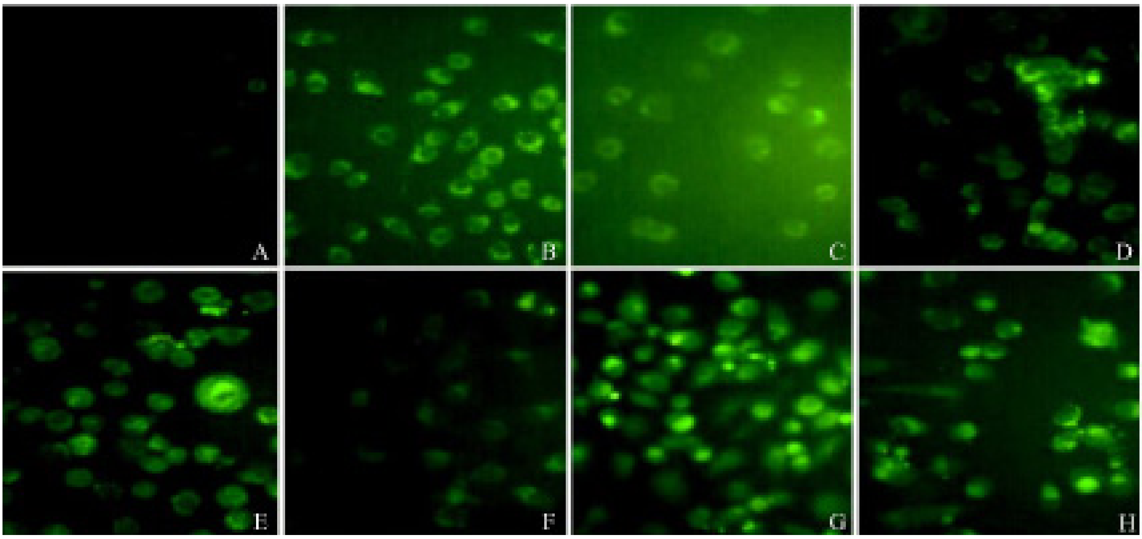

图 4 印楝素和喜树碱诱导 SL-1 细胞凋亡的 TUNEL 法检测

Fig. 4 TUNEL assay of SL-1 cell apoptosis induced by azadirachtin and camptothecin

A：阴性对照 Negative CK；B：阳性对照 Positive CK；C，D，E：印楝素 Azadirachtin（12，40，66 h，respectively）；
F，G，H：喜树碱 Camptothecin（12，40，66 h，respectively）

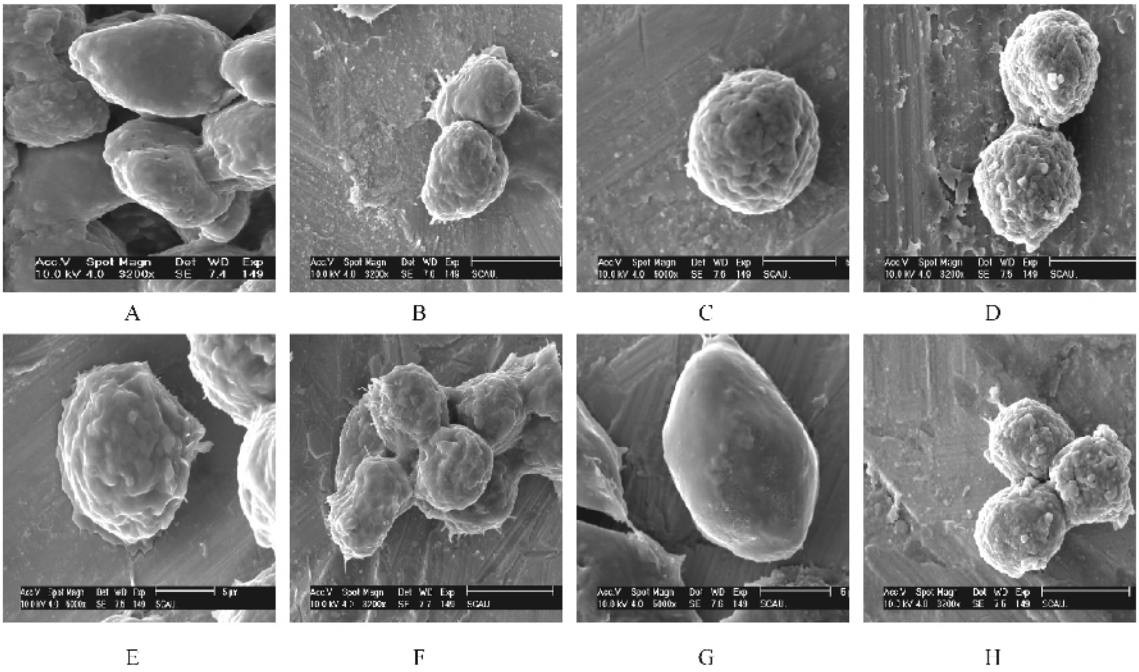

图 5 印楝素和喜树碱处理对 SL-1 细胞表面结构的影响

Fig. 5 Effects of azadirachtin and camptothecin on the surface of SL-1 cell membrane observed with scan electron microscopy

A：对照 CK；B，C，D，E：印楝素 Azadirachtin（2，12，24，36 h，respectively）；
F，G，H：喜树碱 Camptothecin（2，12，24 h，respectively）

“Nimbolide”的三萜类化合物，该化合物能够有效的抑制 U937，HL-60，THP1 和 B16 等肿瘤细胞的生长和增殖，可显著降低 G0/G1 细胞比例，增加 S 期和 G2/M 期细胞比例，并认为是通过干扰细胞周期，上调 p21 表达而抑制 HT-29 细胞的生长。Subapriya 等（2005，2006）研究 7，12-二甲基苯并蒽诱导地鼠颊囊癌变过程中，发现印楝叶乙醇提取物可以降低增殖细胞核抗原、突变细胞 p53 和 Bcl-2 的表达，刺激细胞角蛋白过表达，通过调节 Bcl-2，Bim，caspase 8 和 caspase 3 活性和表达抑制细胞增殖和诱导细胞分化和凋亡从而起到抗癌作用。DiIlio 等（2006）通过 TUNEL 法、增殖细胞核抗原检测表明印楝油中非萜类极性成分对鼠纤维原细胞具有诱导凋亡、抑制增殖的作用。

在印楝对昆虫细胞毒理的研究方面，Remnold 和 Annadurai（1993）最早研究了印楝素对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞系 Sf-9 细胞的作用，认为印楝素通过抑制细胞增殖和蛋白质合成导致细胞死亡。Cohen 等（1996）报道了从楝科植物分离的多种柠檬素类化合物对 Sf-9 的毒杀活性。Salehzadeh 等（2002，2003）利用 MTT 法测定结果表明，印楝素处理后 96 h 对 Sf-9 抑制增殖有效中浓度（EC_{50}）为 1.5×10^{-10} mol/L，以 5×10^{-6} mol/L 处理 Sf-9 细胞 2 h 后细胞有丝分裂指数达到最大值，处理后 20 h 后处于 G2/M 期细胞达 90%，与紫杉醇（taxol）处理结果差异不显著。Anuradha 等（2007）研究认为印楝素导致黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 畸形可能是由于印楝素引起细胞骨架肌动蛋白解聚合作用和重新组合，使不同组织产生不同程度的畸形。印楝素对果蝇离体培养细胞系 Kc-167 的 48 h 增殖抑制中浓度为 1.7×10^{-7} mol/L，以 5×10^{-7} mol/L 以上浓度处理后 6 h，Kc-167 细胞即表现出明显的核酸损伤，处理后 24 h 即使浓度低至 1×10^{-9} mol/L 也能够观察到细胞核酸受损（Robertson *et al*.，2007）。这些报道对于深入了解印楝素的细胞作用机理提供了很好的参考作用。但这些报道均未系统、明确证实印楝素是否具有昆虫细胞凋亡诱导作用。本文则是首次系统应用形态学、生理生化特征、流式细胞术等，明确印楝素对斜纹夜蛾离体培养细胞系 SL-1 具有显著的细胞凋亡诱导作用。细胞凋亡是多细胞生物体固有的生命现象，几乎每个器官组织的发育都有自身的细胞凋亡规律，控制着各自的适当的发育（Zhou *et al*.,2006；Yan *et al*.,2007），能够显著加速或延缓细胞凋亡的化合物都可能开发成新药物（Stephen，2005；Shi and Li，2007；Magedov *et al*.，2007）。所以，本文结果不仅为全面、深入研究阐述印楝素对昆虫的作用机制尤其是生长发育调节机理（Mirkes,2008）提供了一个新角度，而且对于筛选植物源昆虫细胞凋亡诱导（抑制）剂，研制新农药具有参考价值。

喜树碱是存在于我国特有植物珙桐科（Nyssacea）喜树 *Camptotheca acuminate* Decaisne 等植物的含有喹啉、内酯和内酰胺的五环化合物，其作用机理是不可逆抑制拓扑异构酶Ⅰ（TopoⅠ）活性，与 TopoⅠ-DNA 复合物结合形成三元复合物阻断单链 DNA 在切口部位重新结合，使瞬时 DNA 单链断裂连接成永久断裂，最终导致细胞凋亡（Chrencik *et al*.，2004；Balaña-Fouce *et al*.，2006），被认为是过去 40 年中细胞凋亡诱导抗癌天然药物中最为重要的发现之一（Lorence and Nessler，2004）。Rhee 等（1998）研究表明 0.344 μg/mL（即 1.0 μmol/L）喜树碱诱导 Sf-9 细胞 18 h 凋亡率为 33.4%。本文以其作为参照物研究印楝素诱导昆虫细胞凋亡机制。前期实验结果表明，印楝素 0.1～5.0 μg/mL 和喜树碱 0.17～6.97 μg/mL（即 0.5～20.0 μmol/L）处理供试 SL-1 细胞后 24～60 h 均呈现细胞凋亡典型形态学特征，如细胞体积变小，细胞膜气泡化，随即与邻周细胞脱落，胞浆浓缩，胞膜突起，细胞浆中细胞器密集，核染色质浓缩并凝聚在核膜周边，核仁裂解进而胞膜内陷，自行裂解为多个有外膜包裹、内涵物不外溢的凋亡小体（水克娟，2007；钟国华等，2008）。凋亡诱导作用程度与快慢与诱导物剂量有关，药剂处理浓度过高（如印楝素 5.0 μg/mL 和喜树碱 6.97 μg/mL）都可能引起培养液渗透压过高而使细胞膜受到物理性损伤，细胞边际模糊破碎，直至漂浮，造成细胞坏死；浓度太低（如印楝素 0.1 μg/mL 和喜树碱 0.17 μg/mL）则大量凋亡小体出现较慢。从凋亡小体诱导效果、诱导时间出发，并运用倒置相差显微镜观察、AO 荧光探针染色显微镜观察、电子显微镜观察及 TUNEL 等多种方法确证印楝素 0.75 μg/mL 和喜树碱 1.72 μg/mL 均可诱导 SL-1 细胞产生典型的凋亡。

印楝素对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用与喜树碱的诱导作用既有相似性，也有不同点。首先，两者对 SL-1 细胞凋亡诱导作用的形态学变化具有一定程度相似性，均由细胞皱缩、核偏移和细胞间隔增大等现象开始变化，随后凋亡小体数量不断增多并扩散分布，最后进入正常形态细胞吞噬凋亡小体的细胞凋亡晚期。扫描电镜研究结果也表明，两者处理的 SL-1 细胞膜并未出现明显的“孔”、“洞”、“门”结构（图 5）。其次，两者凋亡诱导的时序性不同，印楝素 0.75 μg/mL 诱导处理 0～36 h 为凋亡早期，36～60 h 属于凋亡中期，60 h 后为细胞凋亡晚期。喜树碱 1.72 μgl/mL 诱导处理 0～24 h 属于凋亡早期，处理后 24～54 h 为凋亡中期，处理后 54 h 凋亡小体数量最多，60 h 后进入凋亡晚期。第三，两者凋亡效应有差异，从凋亡时序性推测，喜树碱诱导凋亡效应启动较快，使核酸被切割断裂较早，推测大片段 DNA 存在时间较短，随后立即断裂为间隔 180～200 bp 规则条带，表现为凋亡率迅速增大，而印楝素诱导效应表现较慢，断裂为片段 DNA 的时间相对较长，两者时长相互重叠交错。从本文结果推测，印楝素和喜树碱诱导细胞凋亡均可能是由于首先启动细胞膜上的

信号通路，但在凋亡信号转导方式和途径上有所差别，因此变化规律不完全一致，具体机制有待于进一步研究。

参考文献（References）

Anuradha A，Annadurai RS，Shashidhara LS，2007. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid azadirachtin A. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，37(6)：627－634.

Balaña-Fouce R，Redondo CM，Pérez-Pertejo Y，Díaz-González R，Reguera RM，2006. Targeting a typical trypanosomatid DNA topoisomerase I. *Drug Discovery Today*，11(15－16)：733－740

Baxa DM，Luo X，Yoshimura FK，2005. Genistein induces apoptosis in T lymphoma cells via mitochondrial damage. *Nutrition and Cancer*，51(1)：93－101.

Bose A，Haque E，Baral R，2007. Neem leaf preparation induces apoptosis of tumor cells by releasing cytotoxic cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. *Phytotherapy Research*，21(10)：914－920.

Callus BA，Vaux DL，2007. Caspase inhibitors：viral，cellular and chemical. *Cell Death and Differentiation*，14：73－78.

Chrencik JE，Staker BL，Burgin AB，Pourquier P，Pommier Y，Stewart L，Redinbo MR，2004. Mechanisms of camptothecin resistance by human topoisomerase I mutations. *Journal of Molecular Biology*，339 (4)：773－784.

Cohen E，Quistad GB，Casida JE，1996. Cytotoxicity of nimbolide，epoxy-azadiradione and other limonoids from neem insecticide. *Life Sciences*，58(13)：1 075－1 081.

Dai XY，Xu SQ，Chen XL，Yi HG，Liu XG，2006. Effects of environmental hormone Atrazine on the cultured BmN cells. *Canye Kexue*，32(4)：495－499. [**戴璇颖 徐世清，陈息林，裔洪根，柳学广**，2006. **环境激素阿特拉津对家蚕卵巢培养细胞**(BmN)**凋亡的影响. 蚕业科学**，32(4)：495－499]

DiIlio V，Pasquariello N，van der Esch AS，Cristofaro M，Scarsella G，Risuleo G，2006. Cytotoxic and antiproliferative effects induced by a non terpenoid polar extract of *A. indica* seeds on 3T6 murine fibroblasts in culture. *Molecular and Cellular Biochemistry*，287(1－2)：69－77.

Gerschenson LE，Rotello RJ，1992. Apoptosis：a different type of cell death. *FASEB Journal*，6：450 －455.

Hacker G，2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research*，301(1)：5－17.

Kerr JFR，Winterford CM，Harmon BV，1994. Apoptosis：its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*，73：2 013－2 026.

Kerr JFR，Wyllie AH，Currie AR，1972. Apoptosis：a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kenetics. *British Journal of Cancer*，26：239－257.

Léry X，Charpentier G，Belloncik S，1999. DNA content analysis of insect cell lines by flow cytometry. *Cytotechnology*，29：103－113.

Lim JY，Lee BH，Kang SW，Wago H，Han SS，2004. Association of reticular cells with CD34+/Sca-1+ apoptotic cells in the hemopoietic organ of grasshopper，*Euprepocnemis shirakii*. *Journal of Insect Physiology*，50(7)：657－665.

Lorence A，Nessler CL，2004. Camptothecin，over four decades of surprising findings. *Phytochemistry*，65(20)：2 735－2 749.

Luo KJ，Pang Y，2006. *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis. *Journal of Insect Physiology*，52(8)：795－806.

Magedov IV，Manpadi M，Rozhkova E，Przheval'skii NM，Rogelj S，Shors ST，Steelant WFA，Van Slambrouck S，Kornienko A，2007. Structural simplification of bioactive natural products with multicomponent synthesis：Dihydropyridopyrazole analogues of podophyllotoxin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*，17(5)：1 381－1 385.

Mirkes PE，2008. Cell death in normal and abnormal development. *Congenital Anomalies*，48 (1)：7－17.

Parthasarathy R，Palli SR，2007. Developmental and hormonal regulation of midgut remodeling in a lepidopteran insect，*Heliothis virescens*. *Mechanisms of Development*，124(1)：23－34.

Peng LM，Wang ZL，2000. The Basics and Clinics of Apoptosis. People's Medical Publishing House，Beijing. 1－9，153－218. [**彭黎明，王曾礼**. 2000. **细胞凋亡的基础与临床. 北京：人民卫生出版社**. 1－9，153－218]

Remnold H，Annadurai RS，1993. Azadirachtin inhibits proliferation of Sf-9 cells in monolayer-culture. *Journal of Biosciences*，48(5－6)：495－499.

Rhee WJ，Kim EJ，Park TH，2002. Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*，295(4)：779－783.

Robertson SL，Ni WT，Dhadialla TS，Nisbet AJ，McCusker C，Ley SV，Mordue W，Mordue (Luntz) AJ，2007. Identification of a putative azadirachtin-binding complex from *Drosophila* Kc167 cells. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*，64(4)：200－208.

Roy MK，Kobori M，Takenaka M，Nakahara K，Shinmoto H，Isobe S，Tsushida T，2007. Antiproliferative effect on human cancer cell lines after treatment with nimbolide extracted from an edible part of the neem tree (*Azadirachta indica*). *Phytotherapy Research*，21(3)：245－250.

Roy MK，Kobori M，Takenaka M，Nakahara K，Shinmoto H，Tsushida T，2006. Inhibition of colon cancer (HT-29) cell proliferation by a triterpenoid isolated from *Azadirachta indica* is accompanied by cell cycle arrest and up-regulation of p21. *Planta Medicine*，72(10)：917－923.

Salehzadeh A，Akhkha A，Cushley W，Adams RLP，Kusel JR，Strang RHC，2003. The antimitotic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，33：681－689.

Salehzadeh A，Jabbar A，Jennens L，Ley SV，Annadurai RS，Adams RLP，Strang RHC，2002. The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. *Pest Management Science*，58：268－276.

Schmutterer H，1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree，*Azadirachta indica*. *Annual Reviews of Entomology*，35：271－297.

Schmutterer H，1995. The Neem Tree：Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management，Medicine Industy and Other Purposes. VCH Publishers，New York. 495－517.

Schmutterer H，2002. The Neem Tree. Neem Foundation，67-A.

Vithalnager，Rd No.12NS. Juhu Scheme，Mumbai - 400049，India.

Shi YL，Li MF，2007. Biological effects of toosendanin，a triterpenoid extracted from Chinese traditional medicine. *Progress in Neurobiology*，82(1)：1 - 10.

Shui KJ，2007. Apoptosis Induced by Botanical Insecticides，Zzadirachtin and Camptothecin in SL-1 Cell Line. MSc Thesis，South China Agricultural University，Guangzhou. [水克娟，2007. 印楝素、喜树碱诱导 SL-1 细胞凋亡及作用机制研究. 广州：华南农业大学硕士学位论文]

Stephen WF，2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*，5(12)：995.

Subapriya R，Bhuvaneswari V，Nagini S，2005. Ethanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract induces apoptosis in the hamster buccal pouch carcinogenesis model by modulation of Bcl-2，Bim，caspase 8 and caspase 3. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*，6(4)：515 - 520.

Subapriya R，Kumaraguruparan R，Nagini S，2006. Expression of PCNA，cytokeratin，Bcl-2 and p53 during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by ethanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract. *Clinical Biochemistry*，39(11)：1 080 - 1 087.

Xia Q，Sun HX，Hu X J，Shu YH，Gu DX，Zhang GR，2005. The haemocyte apoptosis in larvae of *Spodoptera litura* Fabricius stressed by heavy metal zinc. *Chinese Science Bulletin*，50(23)：2 613 - 2 616. [夏嫱，孙虹霞，胡新军，舒迎花，古德祥，张古忍，2005. 重金属 Zn^{2+} 胁迫诱导斜纹夜蛾幼虫血细胞凋亡. 科学通报，50(23)：2 613 - 2 616]

Yan L，Vatner DE，O'Connor JP，Ivessa A，Ge H，Chen W，Hirotani S，Ishikawa Y，Sadoshima J，Vatner SF，2007. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell*，130(2)：247 - 258

Zhang YH，Bhunia A，Wan KF，Lee MC，Chan SL，Yu VCK，Mok YK，2006. Chelerythrine and sanguinarine dock at distinct sites on BclXL that are not the classic BH3 binding cleft. *Journal of Molecular Biology*，364(3)：536 - 549.

Zhong GH，Shui KJ，Huang JF，Jia JW，Hu MY，2008. Induction of apoptosis by botanical components in *Spodoptera litura* cultured cell line. *Acta Entomologica Sincia*，51(4)：449 - 453. [钟国华，水克娟，黄劲飞，贾建文，胡美英，2008. 植物源物质诱导的斜纹夜蛾细胞凋亡. 昆虫学报，51(4)：449 - 453]

Zhou YJ，Wang JH，Zhang J，2006. Hepatocyte growth factor protects human endothelial cells against advanced glycation end products-induced apoposis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*，344(2)：658 - 666

（责任编辑：赵利辉）